·论 著·

敲低造血前B细胞白血病转录因子相互作用蛋白对胰腺癌细胞增殖、周期和凋亡的影响

赵一鸣，杨 刚，由 磊，胡 亚，赵玉沛

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院基本外科，北京 100730

通信作者：赵玉沛 电话：010-69156007，电子邮件：zhao8028@263.net

摘要：目的 探讨造血前B细胞白血病转录因子相互作用蛋白（HPIP）对胰腺癌细胞增殖、周期及凋亡的影响。**方法** 采用免疫组织化学染色方法检测胰腺癌组织及对应癌旁组织中HPIP的表达水平，小干扰RNA瞬时转染的方法敲低胰腺癌细胞中HPIP的表达水平，细胞计数试剂盒-8实验、克隆形成实验、流式细胞术检测敲低HPIP对细胞增殖、周期及凋亡的影响，免疫印迹法检测敲低HPIP对于cyclin D1、caspase 7和cleaved caspase 7表达水平的影响。**结果** 胰腺癌组织中HPIP的表达明显高于癌旁组织（$Z=-2.060$，$P=0.039$）。敲低HPIP表达水平后，在24 h起MIA PaCa-2和BxPC-3细胞的生长受到抑制（P均<0.05）；MIA PaCa-2（$t=4.706$，$P=0.009$）和BxPC-3细胞（$t=9.514$，$P=0.000$）形成的阳性克隆数明显减少；MIA PaCa-2（$t=7.642$，$P=0.001$）及BxPC-3细胞（$t=2.714$，$P=0.051$）中S期细胞比例明显降低，G_0/G_1期细胞比例明显增加（$t=3.244$，$P=0.031$；$t=6.095$，$P=0.003$）；MIA PaCa-2（$t=24.58$，$P=0.000$；$t=29.43$，$P=0.000$）和BxPC-3细胞（$t=36.45$，$P=0.000$；$t=43.52$，$P=0.000$）中的晚期凋亡率和总凋亡率均明显上升；MIA PaCa-2（$t=6.705$，$P=0.002$）和BxPC-3细胞（$t=6.238$，$P=0.003$）的cyclin D1表达水平明显下降，caspase 7表达水平变化无统计学意义（$t=0.711$，$P=0.516$；$t=0.027$，$P=0.979$），cleaved caspase 7表达水平明显上升（$t=3.991$，$P=0.016$；$t=6.536$，$P=0.002$）。**结论** 与癌旁组织相比，HPIP在胰腺癌中表达水平较高。敲低HPIP可导致胰腺癌细胞生长受到抑制，细胞周期由G_0/G_1期向S期转化受阻，并促进胰腺癌细胞凋亡。HPIP可能在胰腺癌中发挥癌基因作用。

关键词： 胰腺癌；造血前B细胞白血病转录因子相互作用蛋白；细胞周期；细胞增殖；细胞凋亡

中图分类号： R735.9 **文献标志码：** A **文章编号：** 1000-503X(2020)01-0007-09

DOI： 10.3881/j.issn.1000-503X.11192

Effect of Hematopoietic Pre-B-cell Leukemia Transcription Factor Interacting Protein Knockdown on Proliferation, Cell Cycle and Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells

ZHAO Yiming, YANG Gang, YOU Lei, HU Ya, ZHAO Yupei

Department of General Surgery, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

Corresponding author: ZHAO Yupei Tel: 010-69156007, E-mail: zhao8028@263.net

ABSTRACT: Objective To unravel the role of hematopoietic pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein (HPIP) in the proliferation, cell cycle, and apoptosis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells. **Methods** The HPIP expression in PDAC tissue was determined by immunohistochemical staining. Knockdown of HPIP was accomplished in MIA PaCa-2 and BxPC-3 cell lines by transient transfection of HPIP siRNA and validated by Western blotting. Cell proliferation was assessed using the cell counting kit-8 assay

基金项目：中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费（2018PT32014）Supported by the Non-profit Central Research Institute Fund of Chinese Academy of Medical Sciences (2018PT32014)

and colony formation assay. Cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. Western blotting was performed to detect the expression levels of cyclin D1, caspase 7, and cleaved caspase 7. **Results** HPIP was overexpressed in PDAC tissue compared with matched adjacent pancreatic tissue ($Z = -2.060$, $P = 0.039$). Knockdown of HPIP inhibited the proliferation of MIA PaCa-2 and BxPC-3 cells (all $P < 0.05$). Knockdown of HPIP significantly reduced the positive colonies formed by MIA PaCa-2 and BxPC-3 cells ($t = 4.706$, $P = 0.009$; $t = 9.514$, $P = 0.000$). Knockdown of HPIP decreased the proportion of S phase cells ($t = 7.642$, $P = 0.001$; $t = 2.714$, $P = 0.051$) and increased the proportion of G_0/G_1 phase cells ($t = 3.244$, $P = 0.031$; $t = 6.095$, $P = 0.003$) in MIA PaCa-2 and BxPC-3 cells. Meanwhile, knockdown of HPIP increased the proportions of late-phase MIA PaCa-2 and BxPC-3 cells ($t = 24.58$, $P = 0.000$; $t = 36.45$, $P = 0.000$) and the overall apoptosis rate ($t = 29.43$, $P = 0.000$; $t = 43.52$, $P = 0.000$). In MIA PaCa-2 and BxPC-3 cells, knockdown of HPIP decreased the expression level of cyclin D1 ($t = 6.705$, $P = 0.002$; $t = 6.238$, $P = 0.003$) and increased the expression level of cleaved caspase 7 ($t = 3.991$, $P = 0.016$; $t = 6.536$, $P = 0.002$). **Conclusions** HPIP is overexpressed in PDAC tissue. Knockdown of HPIP inhibits the proliferation and G_0/G_1 to S transition of PDAC cells. Meanwhile, knockdown of HPIP promotes the apoptosis of PDAC cells. Thus, HPIP may act as an oncogene in PDAC.

Key words: pancreatic cancer; hematopoietic pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein; cell cycle; cell proliferation; cell apoptosis

Acta Acad Med Sin, 2020,42(1):7-15

胰腺癌是恶性程度最高的实体肿瘤之一，以发现晚、预后差著称，5 年生存率仅为 8%[1]。目前胰腺癌化疗、放疗及靶向治疗的效果总体欠佳[2]。研究胰腺癌的分子机制有可能为胰腺癌治疗提供新的靶点，给胰腺癌治疗带来曙光。造血前 B 细胞白血病转录因子相互作用蛋白（hematopoietic pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein，HPIP），是前 B 细胞白血病同源序列（pre-B-cell leukemia homeobox，PBX）1 的辅助抑制因子[3]，同时也是一个细胞骨架支架蛋白[4]，目前发现在多种恶性肿瘤中扮演癌基因的角色，能够调控肿瘤细胞包括增殖、迁移、侵袭、凋亡、化疗敏感性、细胞黏附形成在内的多种生物学行为[5-15]。但关于 HPIP 与胰腺癌的关系，目前国内外鲜见报道。本研究拟探讨敲低 HPIP 后对于胰腺癌细胞增殖、周期及凋亡的影响。

材料和方法

标本来源及免疫组织化学染色 30 对胰腺导管腺癌及对应癌旁组织来自北京协和医院病理标本库，蜡块切片制备为组织微列阵芯片。经脱蜡水化后，0.3% H_2O_2室温浸泡 30 min 去除内生性过氧化物酶。10%山羊血清室温封闭 10 min，磷酸缓冲盐溶液（phosphate buffer saline，PBS）洗后，应用 1∶1200 HPIP 兔抗人多克隆抗体（12102-1-AP，Proteintech，USA）4 ℃过夜孵育。PBS 溶液洗后，用 1∶200 生物素标记的羊抗兔 IgG（Cell Signaling Technology，USA）稀释于 5% 脱脂牛奶封闭处理 30 ~ 60 min。用 PBS 洗后，滴加亲和素-生物素-辣根过氧化物酶大分子复合物室温孵育 30 min。PBS 洗后，以二氨基联苯胺室温显色。显色后以苏木精复染，脱水封片观察。免疫组织化学切片染色情况由两位病理科医生独立判读，根据染色强弱评分：0 分，无染色；1 分，弱染色；2 分，中度染色；3 分，强染色。根据染色范围评分：0 分，<5%；1 分，5% ~ 25%；2 分，26 ~ 50%；3 分，51 ~ 75%；4 分，>75%。最终评分 = 染色强度评分 × 染色范围评分。

细胞培养 胰腺癌细胞系 MIA PaCa-2 由德国海德堡大学 Dr. Freiss 惠赠，BxPC-3 购自国家实验细胞资源共享平台。MIA PaCa-2 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基（Hyclone，USA），BxPC-3 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基（Hyclone，USA），在 37 ℃、5% CO_2条件下培养，进行实验时细胞均处于对数生长期。

转染及免疫印迹法检测蛋白表达水平 转染应用的小干扰 RNA（siRNA）由广州锐博公司合成，si-HPIP 序列为 5'-CTGGCAGCATTCTAACAGA-3'，阴性对照 si-NC（negative control）序列为 5'-TTCTCCGAAC

GTGTCACGT-3'。将对数生长的细胞分为2组，转染HPIP siRNA的敲低组及转染阴性对照siRNA的阴性对照组，siRNA浓度均为100 nmol/L，应用Lipofectamine 3000（Invitrogen，USA）按说明书进行转染操作，转染48 h后采用RIPA法提取细胞总蛋白。免疫印迹法进行敲低效率验证，一抗应用1∶1500 HPIP多克隆抗体（12102-1-AP，Proteintech，USA）4℃过夜孵育，PBS溶液洗后，用1∶5000 HRP标记的二抗IgG（7074S，Cell Signaling Technology，USA）稀释于5%脱脂牛奶封闭孵育45 min，PBS洗3遍后上机显影。其余抗体信息如下：cyclin D1单克隆抗体（1∶1000，60186-1-Ig，Proteintech，USA）、caspase 7（1∶1000，9492S，Cell Signaling Technology，USA）及cleaved caspase 7（1∶1000，9491S，Cell Signaling Technology，USA）。采用Image J v1.52软件（National Institutes of Health，USA）对于得到的免疫印迹条带进行灰度值测定，相对灰度值=目的条带灰度值/内参灰度值。

细胞计数试剂盒-8检测细胞活性 MIA PaCa-2、BxPC-3细胞按照前述方法分组，转染24 h后以3000细胞/孔的密度接种于96孔板，设6个复孔，分别于接种后0、24、48、72、96 h更换为10%细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）试剂的相应培养基，37 ℃、5% CO_2条件下孵育2 h，酶标仪检测波长450 nm及630 nm的光密度值（optical density，OD），最终读数为$OD_{450\,nm}-OD_{630\,nm}$。

平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力 MIA PaCa-2、BxPC-3细胞系按照前述方法分组，每个组设置3个平行孔，转染24 h后以500细胞/孔的密度接种6孔板，镜下观察保证细胞分散不成团，每周更换2次培养基，培养14 d后4%多聚甲醛固定10 min，PBS冲洗后再用结晶紫染液染色20 min后拍照计数，阳性克隆标准为克隆肉眼可见且经低倍镜确认克隆细胞数大于10个。

流式细胞术检测细胞周期变化 MIA PaCa-2、BxPC-3细胞系按照前述方法分组，每个组设置3个平行孔，6孔板细胞汇合度40%～50%时进行转染，转染72 h后胰酶消化收集至离心管中，1000 r/min（r=15 cm）离心2次，每次5 min，再以300 μl的PBS重悬，－20 ℃预冷的700 μl无水乙醇混匀后4 ℃过夜固定。1000 r/min（r=15 cm）离心5 min去上清，沉淀以500 μl PBS重悬，加入2 μl RNAase A（10 mg/ml）（Thermal Fisher，USA）去除内源性RNA，1 μl Triton X-100（Sigma，USA）增大细胞通透性，室温静置45 min后加入54 μl碘化丙啶（propidium iodide，PI）（终浓度1 mg/1 ml）（Sigma，USA），避光孵育1 min，流式细胞仪（Accuri C6 Flow Cytometer，BD Biosciences，USA）上机检测1×10^4个细胞。ModFit LT 4.1 software（Verity Software House，USA）软件进行细胞周期分析。

流式细胞术检测细胞凋亡率 MIA PaCa-2、BxPC-3细胞系按照前述方法分组，每组设置3个平行孔，6孔板细胞汇合度40%～50%时进行转染，72 h后胰酶消化收集至离心管中，1000 r/min（r=15 cm）离心重悬PBS洗2次，去上清后沉淀再以200 μl结合缓冲液重悬，每个标本加入5 μl膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素混匀，避光静置5 min后再加入10 μl PI（Sigma，USA）混匀，避光静置10 min后流式细胞仪（Accuri C6 Flow Cytometer，BD Biosciences，USA）上机检测1×10^4个细胞。FlowJo 10.0软件（TreeStar，USA）进行细胞凋亡率分析。

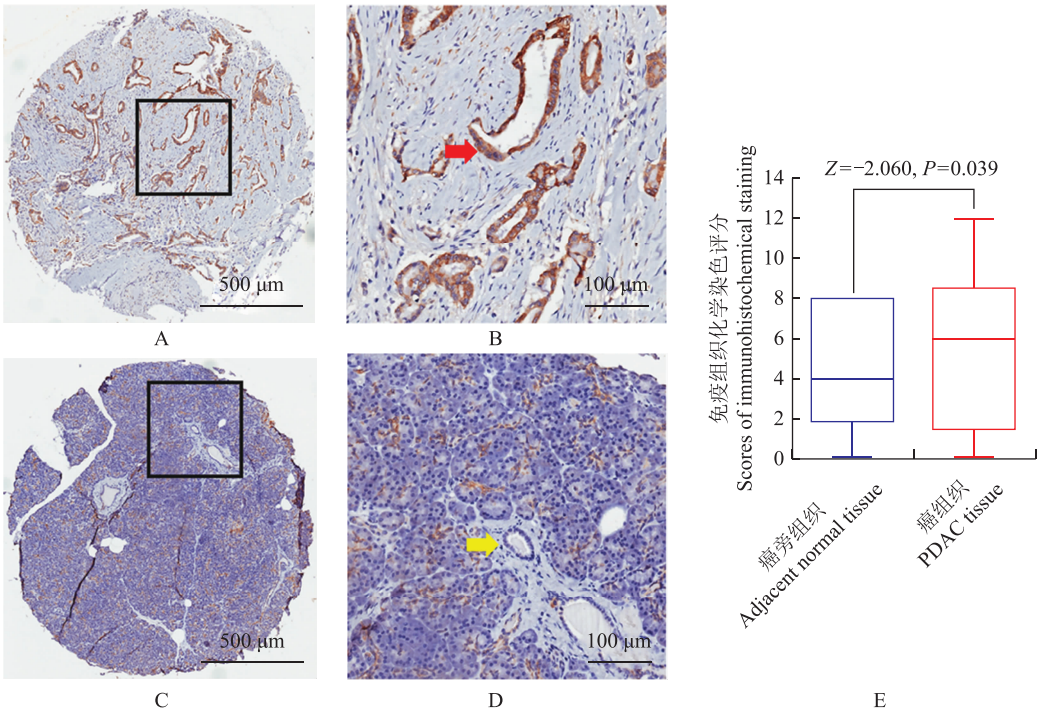
统计学处理 采用SPSS 21.0统计软件，符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示，组间比较采用非配对student't检验；不符合正态分布的计量资料以M（Q_1，Q_3）表示，组间比较采用Wilcoxon秩合检验；$P<0.05$为差异有统计学意义。

结　果

HPIP在胰腺癌组织中高表达 免疫组织化学染色结果显示，HPIP在胰腺癌细胞胞浆表达，在胰腺癌组织中以中高度表达为主（图1A、B），而对应癌旁为中低度表达（图1C、D）。在70%（21/30）的配对标本中，胰腺癌组织中HPIP免疫组织化学染色评分高于对应癌旁组织。而30%（9/30）的配对标本中，胰腺癌组织中HPIP免疫组织化学染色评分低于或等于对应癌旁组织。癌组织与癌旁组织的免疫组织化学染色评分差异有统计学意义（$Z=-2.060$，$P=0.039$）（图1E）。

小干扰RNA敲低HPIP效率验证 免疫印迹法检测结果显示，HPIP敲低组MIA PaCa-2细胞和BxPC-3细胞中的HPIP相对灰度值分别为0.11±0.05和0.18±0.15，均明显低于相应阴性对照组的0.84±0.30（$t=4.011$，$P=0.016$）和1.13±0.11（$t=8.631$，$P=0.001$）（图2A、B）。

敲低HPIP对胰腺癌细胞增殖的影响 CCK-8检测结果显示，MIA PaCa-2细胞中阴性对照组在接种0、24、48、72、96 h的OD值分别为0.25±0.00、0.43±0.01、0.82±0.10、1.52±0.12、2.93±0.10，HPIP敲



HPIP：造血前 B 细胞白血病转录因子相互作用蛋白；PDAC：胰腺导管腺癌

HPIP：hematopoietic pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein；PDAC：pancreatic ductal adenocarcinoma

A、B. 胰腺癌组织，红色箭头代表胰腺导管腺癌上皮组织；C、D. 癌旁组织，黄色箭头代表对应癌旁组织；E. 癌旁组织和癌组织免疫组织化学评分的比较（$n=30$）

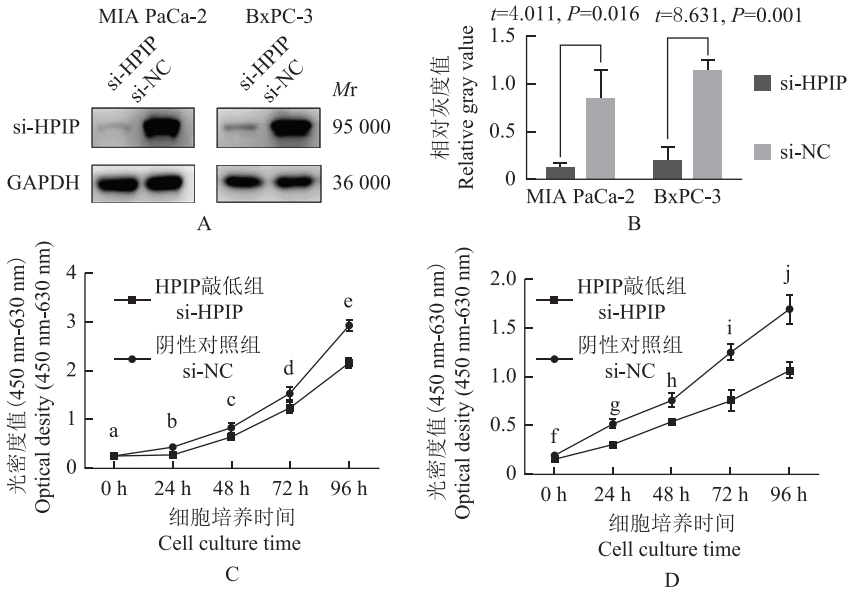
A，B. pancreatic ductal adenocarcinoma tissues（red arrow represents epithelial cells of pancreatic ductal carcinoma）；C，D. normal adjacent tissue（yellow arrow represents normal pancreatic ductal epithelial cells）；E. comparison of scores of immunohistochemistry staining between pancreatic ductal adenocarcinoma tissues and normal adjacent tissue（$n=30$）

图 1 免疫组织化学染色结果

Fig 1 Results of immunohistochemical staining

低组分别为 0.24 ± 0.00、0.27 ± 0.01、0.63 ± 0.05、1.22 ± 0.10、2.14 ± 0.09，其中，HPIP 敲低组在接种细胞 24（$t=13.360$，$P=0.000$）、48（$t=2.838$，$P=0.047$）、72（$t=3.193$，$P=0.033$）、96 h（$t=9.657$，$P=0.000$）的 OD 值均显著低于阴性对照组（图 2C）；BxPC-3 细胞中阴性对照组在接种 0、24、48、72、96 h 的 OD 值分别为 0.17 ± 0.00、0.51 ± 0.03、0.75 ± 0.07、1.25 ± 0.07、1.69 ± 0.14，HPIP 敲低组分别为 0.15 ± 0.00、0.30 ± 0.02、0.54 ± 0.02、0.75 ± 0.10、1.06 ± 0.08，其中，HPIP 敲低组在接种细胞 24（$t=8.010$，$P=0.001$）、48（$t=4.838$，$P=0.008$）、72（$t=6.520$，$P=0.002$）、96 h（$t=6.433$，$P=0.003$）的 OD 值也均显著低于阴性对照组（图 2D）。平板克隆形成实验结果显示，MIA PaCa-2 细胞和 BxPC-3 细胞 HPIP 敲低组的阳性克隆数分别为（273.33 ± 20.13）和（152.00 ± 21.16）个，均明显低于相应阴性对照组的（358.66 ± 24.11）（$t=4.706$，$P=0.009$）和（322.66 ± 22.74）（$t=9.514$，$P=0.000$）（图 3A、B）。

敲低 HPIP 对胰腺癌细胞细胞周期的影响 PI 单染及流式细胞术检测结果显示，转染 HPIP siRNA 72 h 后，MIA PaCa-2 细胞中 HPIP 敲低组 G_0/G_1 期细胞比例为（41.01 ± 1.73）%，明显高于阴性对照组的（38.12 ± 0.86）%（$t=3.244$，$P=0.031$）；S 期细胞比例为（40.83 ± 0.27）%，明显低于阴性对照组的（51.88 ± 2.49）%（$t=7.642$，$P=0.001$）；G_2/M 期细胞比例为（18.16 ± 1.94）%，也明显高于阴性对照组的（10.00 ± 1.85）%（$t=5.272$，$P=0.006$）（图 4A、B）。BxPC-3 细胞中 HPIP 敲低组与阴性对照组的 G_0/G_1 期细胞比例为（37.36 ± 1.65）%，明显高于阴性对照组的（30.06 ± 1.25）%（$t=6.095$，$P=0.003$）；S 期细胞比例为（43.20 ± 0.48）%，明显低于阴性对照组的（48.36 ± 3.20）%（$t=2.714$，$P=0.051$）；G_2/M 期细胞比例为（19.43 ± 1.50）%，与阴性对照组的（21.31 ± 3.95）%差异无统计学意义（$t=0.769$，



si-HPIP：HPIP 敲低组；si-NC：阴性对照组；*M*r：相对分子质量

si-HPIP：HPIP knockdown group；si-NC：negative control group；*M*r：relative molecular mass

[a]$t=1.606$，$P=0.184$；[b]$t=13.360$，$P=0.000$；[c]$t=2.838$，$P=0.047$；[d]$t=3.193$，$P=0.033$；[e]$t=9.657$，$P=0.000$；[f]$t=2.055$，$P=0.109$；[g]$t=8.010$，$P=0.001$；[h]$t=4.838$，$P=0.008$；[i]$t=6.520$，$P=0.002$；[j]$t=6.433$，$P=0.003$

图 2 转染 HPIP siRNA 后 MIA PaCa-2 细胞和 BxPC-3 细胞中 HPIP 表达量变化（A）及对应条带灰度值变化（B，$n=3$），转染 HPIP siRNA 后 MIA PaCa-2 细胞（C）和 BxPC-3 细胞（D）的增殖情况变化

Fig 2 Effect of HPIP siRNA transfection and normal control siRNA transfection on HPIP expression（A）and corresponding relative gray value（B，$n=3$）in MIA PaCa-2 cell line and BxPC-3 cell line and effect of HPIP knockdown on cell proliferation in MIA PaCa-2 cell line（C）and BxPC-3 cell line（D）

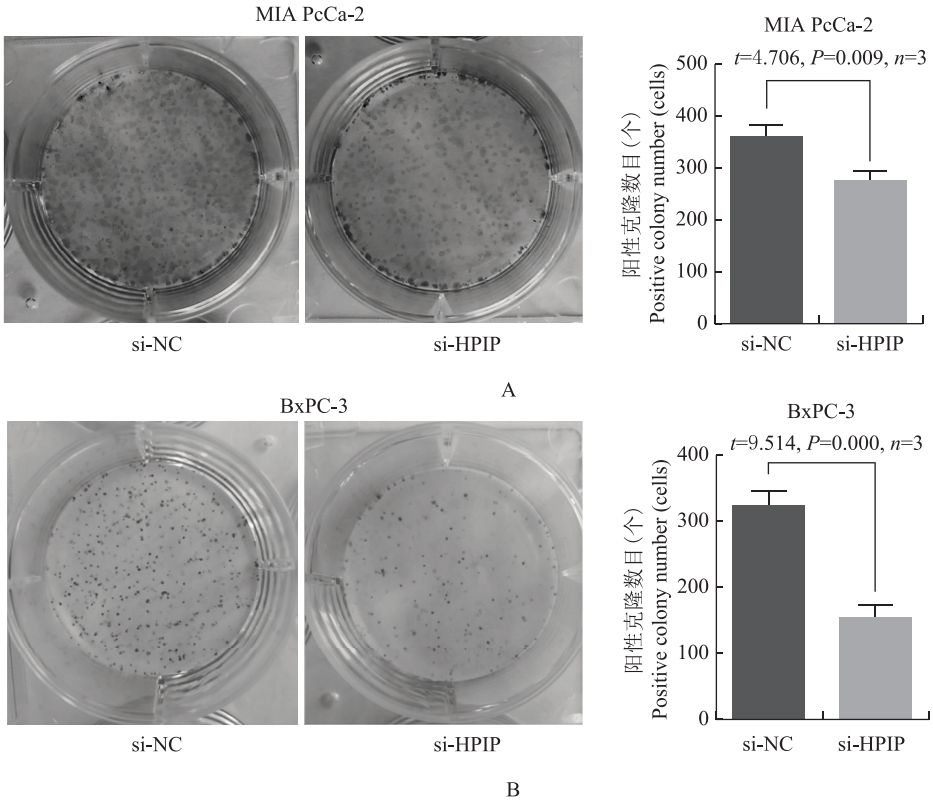
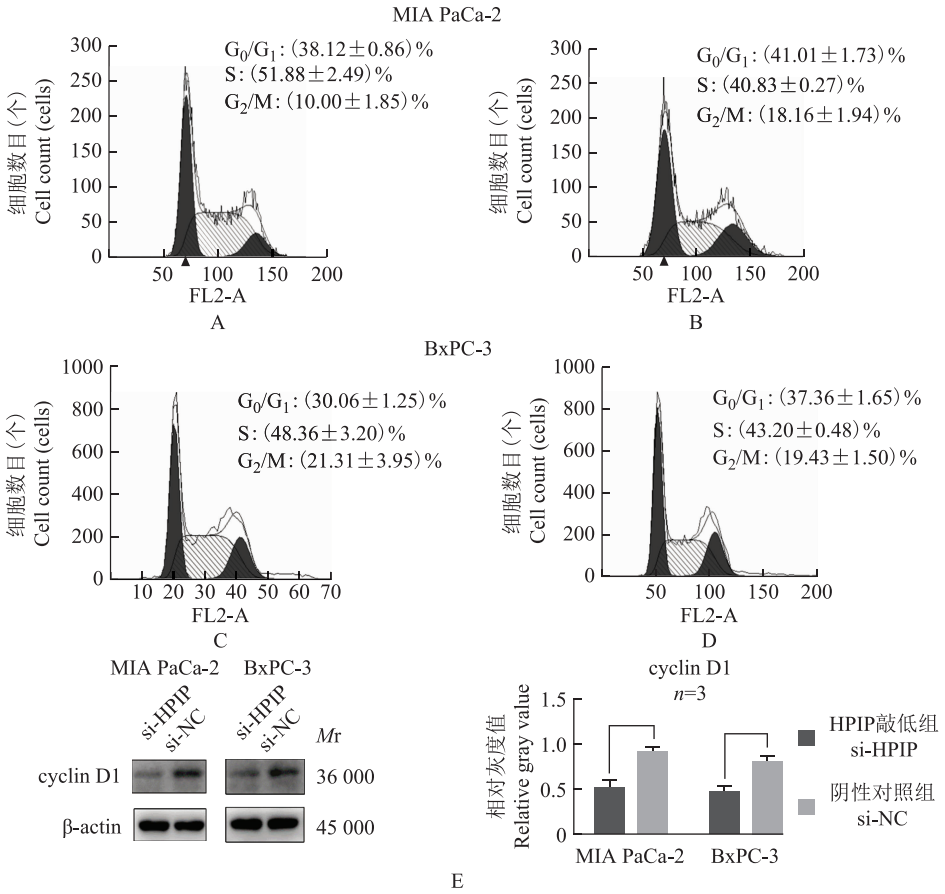


图 3 在 MIA PaCa-2 细胞（A）及 BxPC-3（B）细胞中敲低 HPIP 后细胞克隆形成能力的变化

Fig 3 Effect of HPIP knockdown on colony formation capability in MIA PaCa-2 cell line（A）and BxPC-3 cell line（B）

$P=0.484$）（图 4C、D）。免疫印迹法检测结果显示，MIA PaCa-2 细胞和 BxPC-3 细胞中 HPIP 敲低组的 cyclin D1 条带相对灰度值分别为 0.51 ± 0.08 和 0.45 ± 0.07，均明显低于相应阴性对照组的 0.91 ± 0.05（$t=6.705$，$P=0.002$）和 0.80 ± 0.05（$t=6.238$，$P=0.003$）（图 4E）。

敲低 HPIP 对胰腺癌凋亡的影响 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素和 PI 双染及流式细胞术检测结果显示，转染 HPIP siRNA 72 h 后，MIA PaCa-2 细胞 HPIP 敲低组的晚期凋亡率和总凋亡率分别为（17.23 ± 0.49）% 和（20.40 ± 0.41）%，均明显高于阴性对照组的（7.27 ± 0.29）%（$t=24.58$，$P=0.000$）和（9.36 ± 0.32）%（$t=29.43$，$P=0.000$）（图 5A、B）。BxPC-3 细胞 HPIP 敲低组晚期凋亡率和总凋亡率分别为（26.5 ± 0.53）% 和（30.17 ± 0.41）%，也均明显高于阴性对照组的（8.54 ± 0.44）%（$t=36.45$，$P=0.000$）和（9.90 ± 0.50）%（$t=43.52$，$P=0.000$）（图 5C、D）。免疫印迹检测结果显示，MIA PaCa-2 细胞和 BxPC-3 细胞中 HPIP 敲低组的 caspase 7 条带相对灰度值分别为 0.85 ± 0.07 和 0.77 ± 0.09，均与相应阴性对照组的 0.82 ± 0.02（$t=0.711$，$P=0.516$）和 0.77 ± 0.12（$t=0.027$，$P=0.979$）差异无统计学意义；在 MIA PaCa-2 细胞和 BxPC-3 细胞中 HPIP 敲低组的 cleaved caspase 7 条带相对灰度值分别为 0.29 ± 0.95 和 0.32 ± 0.03，均明显高于相应阴性对照组的 0.07 ± 0.01（$t=3.991$，$P=0.016$）和 0.10 ± 0.04（$t=6.536$，$P=0.002$）（图 5E）。

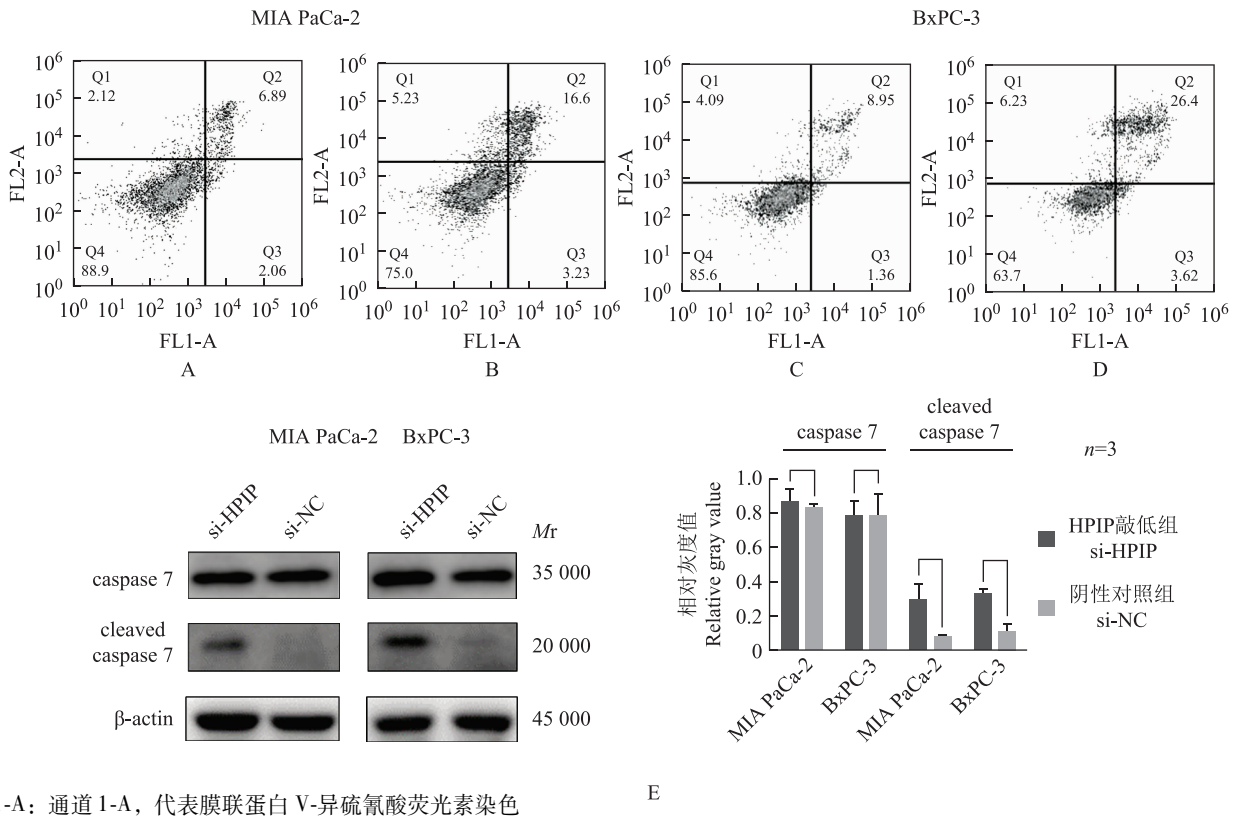


FL2-A：通道 2-A，代表碘化丙啶染色

FL2-A：flow 2-A，representing propidium iodide staining

图 4 在 MIA PaCa-2 细胞中转染阴性对照 siRNA（A）和转染 HPIP siRNA（B）后细胞周期的变化，在 BxPC-3 细胞中转染阴性对照 siRNA（C）和转染 HPIP siRNA（D）后细胞周期的变化，在 MIA PaCa-2、BxPC-3 细胞中转染阴性对照 siRNA 和转染 HPIP siRNA 后 cyclin D1 的表达水平变化（E）

Fig 4 Effect of normal control siRNA transfection（A）and HPIP siRNA transfection（B）on cell cycle distribution in MIA PaCa-2 cell line, effect of normal control siRNA transfection（C）and HPIP siRNA transfection（D）on cell cycle distribution in BxPC-3 cell line, and effect of HPIP knockdown on cyclin D1 expression after transfection with normal control siRNA and HPIP siRNA（E）



FL1-A：通道 1-A，代表膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素染色

FL1-A：flow1-A，representing annexin V-FITC staining

图 5 在 MIA PaCa-2 细胞中转染阴性对照 siRNA（A）和转染 HPIP siRNA（B）后凋亡率的变化，在 BxPC-3 细胞中转染阴性对照 siRNA（C）和转染 HPIP siRNA（D）后凋亡率的变化，和在 MIA PaCa-2（E）、BxPC-3（F）细胞中转染阴性对照 siRNA 和转染 HPIP siRNA 后 caspase 7 和 cleaved caspase 7 的表达水平变化

Fig 5 Effect of normal control siRNA transfection（A）and HPIP siRNA transfection（B）on apoptosis rate in MIA PaCa-2 cell line，effect of normal control siRNA transfection（C）and HPIP siRNA transfection（D）on apoptosis rate in BxPC-3 cell line，and effect of HPIP knockdown on caspase 7 and cleaved caspase 7 expression in MIA PaCa-2 and BxPC-3 cell lines（E）

讨　论

胰腺癌以预后差、术后早期复发、易出现放化疗耐受著称，对于胰腺癌分子机制的研究有助于改善这一现状。多种信号通路在胰腺癌发生发展中具有交叉作用，共同导致了胰腺癌的恶性生物学行为[16]。近年发现，HPIP 在包括乳腺癌、结直肠癌、胃癌在内的多种恶性肿瘤中呈高表达，且 HPIP 高表达可以作为上述肿瘤预后不良的独立风险预测因素[10,13,15,17]。HPIP 作为一种细胞骨架结合蛋白，又与黏着斑激酶（focal adhesion kinase，FAK）、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B（phosphoinositide 3 kinase/AKT，PI3K/AKT）、Hedgehog 等信号通路密切相关[6,9-10]。总体上讲，在多种恶性肿瘤中，HPIP 发挥癌基因的作用。而对于 HPIP 在胰腺癌中扮演的角色目前尚未开展研究。

细胞增殖能力是重要的肿瘤恶性生物学表型之一，受到多种机制调控，其中最重要的机制之一就是细胞周期调控。在肾透明细胞癌、头颈部鳞状细胞癌中，HPIP 通过激活 PI3K/AKT 信号通路，能够促进肿瘤细胞增殖[7-8]。在胃癌、结直肠癌中，研究发现 HPIP 促进细胞周期由 G_1 期向 S 期转化，同时促进 G_2 向 M 期转化，进而增强肿瘤细胞的增殖能力，免疫印迹提示过表达 HPIP 后，胰腺癌细胞中细胞周期蛋白 A（cyclin A）、cyclin B1、cyclin D1 表达水平均显著上升[13,15]。本研究通过 CCK-8 实验发现，在胰腺癌细胞株 MIA PaCa-2 和 BxPC-3 中，敲低 HPIP 可以明显抑制细胞生长。平板克隆形成实验中，在 MIA PaCa-2 细胞及 BxPC-3 中敲低 HPIP 可以显著降低细胞的克隆形成能力。接下来的细胞周期分析中，我们发现与阴性

对照组相比，在两株胰腺癌细胞中敲低 HPIP 均可使 G_0/G_1 期细胞比例增加，同时 S 期细胞比例减少，与此同时还伴有 cyclin D1 的表达水平显著下降。这表明在胰腺癌细胞中，敲低 HPIP 可以通过下调 cyclin D1 的表达水平从而阻滞细胞周期由 G_0/G_1 期向 S 期的转换，抑制胰腺癌细胞增殖。与阴性对照组相比，MIA PaCa-2 细胞中敲低 HPIP 后还出现了 G_2/M 期细胞比例增加的现象。这一群体的细胞比例增加，提示敲低 HPIP 后的 MIA PaCa-2 细胞出现了 G_2/M 期阻滞效应。微管功能障碍是 G_2/M 期阻滞的常见原因之一，HPIP 是细胞骨架的支架蛋白，乳腺癌细胞中开展的微管解聚实验发现 HPIP 可以促进微管聚合，加强微管结构的稳定性[18]。所以我们猜测敲低 HPIP 可能通过降低微管结构的稳定性，导致了 G_2/M 期阻滞。但在本实验中，仅在 MIA PaCa-2 细胞中出现了 G_2/M 期阻滞，故本结论还需进一步验证。

细胞凋亡是影响细胞存活能力的另外一个重要机制。本研究通过流式细胞术检测敲低 HPIP 对胰腺癌细胞凋亡的影响，结果发现在两株胰腺癌细胞中，转染 HPIP siRNA 均会明显提高细胞晚期凋亡率和总凋亡率，同时伴有 cleaved caspase 7 表达水平升高。caspase 7 和 caspase 3 一样，都是细胞凋亡的主要执行者，通过上游如 caspase 9 等分子介导的剪切过程进入活化形式 cleaved caspase 7，导致活性氧类物质积聚，促进细胞从细胞外基质脱离[19-20]。我们在实验中发现在两种胰腺癌细胞中敲低 HPIP 后 caspase 7 表达水平变化不明显，而其活化形式 cleaved caspase 7 表达水平明显增高，这提示 HPIP 可能扮演着抗凋亡的角色。目前在多种恶性肿瘤中反复报道了 HPIP 与 PI3K/AKT 信号通路密切相关，该信号通路与凋亡密切相关[7-9,14,17]。PI3K/AKT 通路中的 AKT 是强有力的激酶，可以通过磷酸化 BCL-2 家族的 BAD、BAX 抑制细胞凋亡过程[21]。AKT 还能够直接磷酸化 caspase 9 的 Ser196 位点，从而抑制凋亡[22]。在结直肠癌中的研究发现，HPIP 能够抑制结直肠癌细胞凋亡，免疫印迹检测发现敲低 HPIP 可以导致 cleaved caspase 3 及 cleaved PARP 表达水平增高，伴有 BAX 表达水平增加，BCL2 表达水平下降[13]。在胰腺癌中可能存在类似的机制，HPIP 可能通过激活 PI3K/AKT 通路在胰腺癌细胞中发挥抗凋亡作用，从而促进肿瘤细胞存活，这也是 HPIP 与胰腺癌在未来的研究方向之一。

本研究中我们发现敲低 HPIP 在 CCK8 实验、平板克隆形成实验中均对于 BxPC-3 抑制作用更加明显，在细胞凋亡实验中 BxPC-3 的凋亡率提高也更显著，细胞周期实验中两个细胞系实验结果也有不同之处。研究显示，MIA PaCa-2 和 BxPC-3 细胞系内在的生物学特性和遗传背景有很大的不同，MIA PaCa-2 细胞来自于低分化的原发胰腺导管腺癌组织，细胞倍增时间为 40 h 左右，遗传背景上有典型的 K-Ras 突变[23]，且天然不表达 E-钙黏蛋白[24]。而 BxPC-3 来自于中低分化的原发胰腺导管腺癌组织，患者没有远处转移、侵犯，细胞倍增时间为 48 ~ 60 h，拥有野生型非活化的 Ras 突变[23]。总的来讲，MIA PaCa-2 相对 BxPC-3 天生具有增生较快、侵袭性强的特点，且 Ras 突变上的差异使得信号通路传导上两者存在明显的差异。在实验中对于 HPIP 的干预，MIA PaCa-2 细胞很可能因为其低分化、K-ras 突变的特性拥有更多的抵御方式，从而延续自己的恶性表型。

综上，本研究结果显示，HPIP 在胰腺癌中异常高表达，敲低 HPIP 能够阻滞细胞周期由 G_1 期向 S 期的转换、促进凋亡，从而促进胰腺癌细胞的增殖，提示在胰腺癌中 HPIP 可能发挥着癌基因的作用。HPIP 同时涉及多条胰腺癌重要的信号通路，有可能是胰腺癌信号通路网络中的交叉作用点，针对 HPIP 的靶向治疗可能同时针对多条信号通路，一举多得。HPIP 有望在未来成为胰腺癌一个新的治疗靶点。

参 考 文 献

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1):7-34. DOI:10.3322/caac.21551.

[2] Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, et al. Pancreatic cancer [J]. Lancet, 2016, 388(10039):73-85. DOI:10.1016/S0140-6736(16)00141-0.

[3] Abramovich C, Shen WF, Pineault N, et al. Functional cloning and characterization of a novel nonhomeodomain protein that inhibits the binding of PBX1-HOX complexes to DNA [J]. J Biol Chem, 2000, 275(34):26172-26177. DOI:10.1074/jbc.M001323200.

[4] Boonyaratanakornkit V. Scaffolding proteins mediating membrane-initiated extra-nuclear actions of estrogen receptor [J]. Steroids, 2011, 76(9):877-884. DOI:10.1016/j.steroids.2011.02.017.

[5] Wang D, Wang L, Zhou Y, et al. The involvement of hematopoietic pre-B cell leukemia transcription factor-interacting protein in regulating epithelial-mesenchymal transition of human spinal glioblastoma [J]. Tumour Biol, 2016, 37(5):

5897-5903. DOI:10. 1007/s13277-015-4453-4.

[6] Pan J, Qin Y, Zhang M. HPIP promotes non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion through regulation of the Sonic hedgehog signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 77:176-181. DOI:10. 1016/j. biopha. 2015. 12. 012.

[7] Mai H, Xu X, Mei G, et al. The interplay between HPIP and casein kinase 1α promotes renal cell carcinoma growth and metastasis via activation of mTOR pathway [J]. Oncogenesis, 2016, 5(10):e260. DOI:10. 1038/oncsis. 2016. 44.

[8] Chen Y, Zhao R, Zhao Q, et al. Knockdown of HPIP inhibits the proliferation and invasion of head-and-neck squamous cell carcinoma cells by regulating PI3K/AKT signaling pathway [J]. Oncol Res, 2016, 24(3):153-160. DOI:10. 3727/096504016X14612603423476.

[9] Wang SC, Chai DS, Chen CB, et al. HPIP promotes thyroid cancer cell growth, migration and EMT through activating PI3K/AKT signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2015, 75:33-39. DOI:10. 1016/j. biopha. 2015. 08. 027.

[10] Bugide S, David D, Nair A, et al. Hematopoietic PBX-interacting protein (HPIP) is over expressed in breast infiltrative ductal carcinoma and regulates cell adhesion and migration through modulation of focal adhesion dynamics [J]. Oncogene, 2015, 34(35):4601-4612. DOI:10. 1038/onc. 2014. 389.

[11] van Vuurden DG, Aronica E, Hulleman E, et al. Pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1 is overexpressed in astrocytoma and promotes tumor cell growth and migration [J]. Neuro Oncol, 2014, 16(7):946-959. DOI:10. 1093/neuonc/not308.

[12] Xu X, Jiang C, Wang S, et al. HPIP is upregulated in liver cancer and promotes hepatoma cell proliferation via activation of G2/M transition [J]. IUBMB life, 2013, 65(10):873-882. DOI:10. 1002/iub. 1202.

[13] Feng Y, Xu X, Zhang Y, et al. HPIP is upregulated in colorectal cancer and regulates colorectal cancer cell proliferation, apoptosis and invasion [J]. Sci Rep, 2015, 5:9429. DOI:10. 1038/srep09429.

[14] Bugide S, Gonugunta VK, Penugurti V, et al. HPIP promotes epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance in ovarian cancer cells through PI3K/AKT pathway activation [J]. Cell Oncol (Dordr), 2017, 40(2):133-144. DOI:10. 1007/s13402-016-0308-2.

[15] Feng Y, Li L, Zhang X, et al. Hematopoietic pre-B cell leukemia transcription factor interacting protein is overexpressed in gastric cancer and promotes gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion [J]. Cancer Sci, 2015, 106(10):1313-1322. DOI:10. 1111/cas. 12754.

[16] You L, Chen G, Zhao YP. Core signaling pathways and new therapeutic targets in pancreatic cancer [J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(9):1210-1215. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 0366-6999. 2010. 09. 020.

[17] Wang X, Yang Z, Zhang H, et al. The estrogen receptor-interacting protein HPIP increases estrogen-responsive gene expression through activation of MAPK and AKT [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1783(6):1220-1228. DOI:10. 1016/j. bbamcr. 2008. 01. 026.

[18] Yu B, Tian X, Zhang L, et al. Hematopoietic PBX-interaction protein promotes breast cancer sensitivity to paclitaxel through a microtubule-dependent mechanism [J]. DNA Cell Biol, 2016, 35(11):740-745. DOI:10. 1089/dna. 2016. 3318.

[19] Lamkanfi M, Kanneganti TD. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(1):21-24. DOI:10. 1016/j. biocel. 2009. 09. 013.

[20] Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis [J]. BMC Cell Biol, 2013, 14:32. DOI:10. 1186/1471-2121-14-32.

[21] Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival [J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1):59-71. DOI:10. 1111/j. 1582-4934. 2005. tb00337. x.

[22] Xin M, Deng X. Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation [J]. J Biol Chem, 2005, 280(11):10781-10789. DOI:10. 1074/jbc. M500084200.

[23] Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, et al. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines [J]. Pancreas, 2010, 39(4):425-435. DOI:10. 1097/MPA. 0b013e3181c15963.

[24] Batlle E, Sancho E, Francí C, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(2):84-89. DOI:10. 1038/35000034.

(收稿日期: 2019-01-24)